

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-191699

(43)Date of publication of application : 11.07.2000

(51)Int.Cl.

C07K 16/44  
G01N 33/53  
G01N 33/577  
// C12N 5/10  
C12N 15/02  
C12P 21/08  
(C12N 5/10  
C12R 1:91 )  
(C12N 15/02  
C12R 1:91 )

(21)Application number : 10-373369

(71)Applicant : TEIJIN ECO SCI KK

(22)Date of filing : 28.12.1998

(72)Inventor : MIURA KAZUNOBU  
KATAOKA CHIWA  
SAKAKI JUNKO  
WATANABE MASUMI

(54) MONOCLONAL ANTIBODY TO BE SPECIFICALLY REACTED WITH COPLANAR PCB SUBSTANTIALLY NOT REDUCING ANTIGEN RECOGNITION CHARACTERISTIC EVEN IN 50 (V/V)% AQUEOUS SOLUTION OF ORGANIC SOLVENT, AND ITS MEASUREMENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a monoclonal antibody capable of omitting the pretreatment of extraction with an organic solvent and analyzing a coplanar PCB simply quickly in high accuracy by making the antigen recognition characteristics not lowered even in an aqueous solution of an organic solvent having a fixed concentration.

SOLUTION: This monoclonal antibody recognizes a coplanar PCB such as 3,3,3',4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-#77), 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (PCB-#126) or 3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl (PCB-#169) and will not be substantially lowered in antigen recognition characteristics even in 50 (v/v)% aqueous solution of an organic solvent. A coplanar PCB existing in an aqueous solution of an organic solvent or a buffer solution not containing an organic solvent is brought into contact with the monoclonal antibody to form an antigen-antibody complex and the amount of the antigen-antibody complex formed is measured to measure the coplanar PCB.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

10.05.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision]

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**THIS PAGE BLANK** (USPT)

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**


---

[Claim(s)]

[Claim 1] The monoclonal antibody to which it is the monoclonal antibody which recognizes coplanar one PCB, and an antigen recognition property does not fall substantially in 50(v/v) % organic solvent water solution.

[Claim 2] coplanar one -- PCB -- three -- four -- three -- ' -- four -- ' -- tetra--- chloro -- a biphenyl (PCB-#77) -- three -- four -- five -- three -- ' -- four -- ' -- PENTA -- chloro -- a biphenyl (PCB-#126) -- or -- three -- four -- five -- three -- ' -- four -- ' -- five -- ' -- hexa -- chloro -- a biphenyl (PCB-#169) -- it is -- being according to claim 1 -- a monoclonal antibody .

[Claim 3] The measuring method coplanar [ PCB ] characterized by contacting coplanar one PCB which exists in the buffer solution (a water solution is included) which does not contain an organic solvent water solution or an organic solvent to a monoclonal antibody according to claim 1 or 2, making an antigen antibody complex form, and measuring the amount of formation of this complex.

[Claim 4] The measuring method coplanar [ PCB ] in an oily specimen characterized by converting into coplanar one PCB in an oily specimen by contacting an organic solvent in the oily specimen containing coplanar one PCB, extracting coplanar one PCB in an oily specimen in an organic solvent, and measuring coplanar one PCB in this organic solvent using a monoclonal antibody.

[Claim 5] The measuring method coplanar [ PCB ] in the oily specimen according to claim 4 whose monoclonal antibodies are one of monoclonal antibodies according to claim 1 to 2.

---

[Translation done.]

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPJ are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In-the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the measuring method coplanar [ PCB ] in the monoclonal antibody which reacts to coplanar one PCB specifically, and the oily specimen using it.

[0002]

[Description of the Prior Art] PCB has done damage to Homo sapiens, such as a Kanemi oil poisoning symptom incident, from the toxicity, it is specified as the 1st sort specified chemical substances of the law about an examination, manufacture, etc. of a chemical, and manufacture, use, etc. are forbidden. However, since PCB is generated by incineration in un-meaning with dioxin and is accumulated into an organism by difficulty resolvability, it has the danger of having big effect on Homo sapiens and wildlife. Furthermore, PCB is used as the strong chemical of the misgiving as the so-called environmental hormone (endocrine disruptors), and attracts attention in recent years. The measurement coplanar [ PCB ] which has high toxicity from such a situation especially to a living thing in PCB with the homolog of varieties and an isomer is important. The gas-chromatography method or the high-performance-chromatography method has mainly been adopted as sample analysis in the environment of the oil (especially chemical treatment oil) which contains such a PCB conventionally, soil, water quality, food, etc., or a biological material. However, in this analytical method, the problem that this engineer also needed education and training was in the needing-for preparation of cleanup of sample etc.-considerable time-and-effort and time amount list with a measuring device, a facility, etc. taking the costs of a large sum. Moreover, since analysis of PCB had the great analysis number of cases, simple nature and quick nature are important and it looked forward to development of the analysis method especially in a measurement site (on-site). Then, enzyme immunoassay was developed as an abbreviated analysis method. However, since the monoclonal antibody which is used for the conventional enzyme immunoassay and which is reported was not able to hold an antigen recognition property under organic solvent existence like the antibody stated by this invention, when the organic solvent extract of the PCB was carried out from the inside of a sample, it is a being [ it / a satisfaction \*\*\*\* thing ]-necessarily thing, and the monoclonal antibody which has resistance in an organic solvent was expected from the quantum by enzyme immunoassay.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Then, establishment of the simple and quick analytical method of PCB by the immunological detection approach using an antibody was tried. In this immunological detection approach, although it is an antibody which reacts to coplanar one PCB specifically, since the most important factor may be coplanar [ in an organic solvent and oil / PCB ] when the measuring object coplanar [ PCB ] extracts PCB from environmental water and soil, a biological material, etc. with an organic solvent, it needs for measurement of PCB to be measurable also under organic solvent existence in addition to a drainage system solvent. It was required to obtain an anti-coplanar PCB monoclonal antibody with a high antigen recognition property also by such system of measurement.

[0004] The organic solvent resistance of a monoclonal antibody is required for the process of antigen recognition of an antibody, and since it is performed by the buffer solution (water solution) in the enzyme reaction process which is the next process of enzyme immunoassay, at the time of an enzyme reaction, the organic solvent resistance of the above-mentioned monoclonal antibody is unnecessary. However, it cannot be overemphasized that the enzyme activity of an enzyme labelled antibody is not affected under this organic solvent existence.

[0005] In addition, the quality of an object can be measured like the case where the indicator of the enzyme is carried out, by carrying out the indicator of the fluorochrome instead of carrying out the indicator of the enzyme

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



to the antibody concerned.

[0006]

[Means for Solving the Problem] This invention is a monoclonal antibody which recognizes (1) coplanar PCB. The monoclonal antibody to which an antigen recognition property does not fall substantially in 50(v/v) % organic solvent water solution, (2) -- coplanar one PCB -- 3, 4, 3', and 4' - tetra-chloro biphenyl (PCB-#77) -- three -- four -- five -- three -- ' -- four -- ' - PENTA -- chloro -- a biphenyl (PCB-#126) -- or -- three -- four -- five -- three -- ' -- four -- ' -- five -- ' - hexa -- chloro -- a biphenyl (PCB-#169) -- it is -- the above -- (one --) -- a publication -- a monoclonal antibody -- (3) Contact coplanar one PCB which exists in the buffer solution (a water solution is included) which does not contain an organic solvent water solution or an organic solvent to a monoclonal antibody the above (1) or given in (2), and an antigen antibody complex is made to form. The measuring method coplanar [ PCB ] characterized by measuring the amount of formation of this complex, (4) An organic solvent is contacted in the oily specimen containing coplanar one PCB. Extract coplanar one PCB in an oily specimen in an organic solvent, and it measures coplanar one PCB in this organic solvent using a monoclonal antibody. And it is characterized by converting into coplanar one PCB in an oily specimen. the measuring method coplanar [ PCB ] in an oily specimen, and the measuring method coplanar [ PCB ] in the oily specimen of the above-mentioned (4) publication whose (5) monoclonal antibodies are monoclonal antibodies of the above (1) or (2) publications either -- it comes out.

[0007] After the monoclonal antibody of this invention using as an antigen the complex which made coplanar one PCB combine with the amount support of macromolecules through a linker and carrying out immunity of the mammalian, The immune competence B cell which can produce the antibody to said complex from this mammalian is made to appear. Unite with the tumor cell which can carry out the cell division of this immunocompetent cell continuously, and a hybrid cell is generated. It can obtain by isolating a drainage system solvent and the hybridoma which produces the monoclonal antibody which reacts specifically substantially equally from this hybrid cell also under organic solvent existence to coplanar one PCB, and refining and isolating the monoclonal antibody which this hybridoma produces.

[0008] The measuring method coplanar [ PCB ] using the monoclonal antibody of this invention can be constituted by adding conventionally the amelioration based on the description of the monoclonal antibody of this invention to a well-known immunity measuring method.

[0009]

[Embodiment of the Invention] As what has high toxicity especially among coplanar one PCB, the compound of PCB-#126, PCB-#77, and PCB-#169 grade can be raised, for example. Therefore, it represents and explains by the manufacture approach of the monoclonal antibody to the three above-mentioned compounds. Each isotype of anti-PCB-#77 antibody obtained by this invention, anti-PCB-#126 antibody, and anti-PCB-#169 antibody was IgG. Moreover, when measuring coplanar one PCB using the obtained anti-coplanar PCB monoclonal antibody, if the IgG or its fragmentation, and an example are given, it will be used F(a'b)2.

[0010] A) [a complete antigen (immunogen) chemically-modified [ coplanar / PCB ] degree]

By combining target coplanar one PCB with the amount carrier molecule of macromolecules through a linker, it can consider as the complex which has antigenic. As for coplanar one PCB used, what has high purity is desirable. The carrier molecule of the amount of macromolecules used should just be the macromolecule compound which can raise those immunogenicity that can give it immunogenicity or already exists by having the reaction radical which may be freely used for ligation with the compound which introduced the linker into coplanar one PCB (incomplete antigen), and connecting with this incomplete antigen. The macromolecule compound which contains the freely available reactant amino group especially is desirable. For example, the protein with which molecular weight is rich in the lysine (lysine) between about 10,000 and 150,000 can be raised. Specifically, bovine serum albumin (BSA: molecular weight 66200), a human serum albumin (HSA: molecular weight 58000), rabbit serum albumin (RSA: molecular weight 68000), goat serum albumin (GSA: molecular weight 68000), an ovalbumin (ovalbumin: molecular weight 45000), or a keyhole limpet hemocyanin (KLH: molecular weight 1 million) is raised. If other macromolecule compounds fill the above-mentioned demand, it is possible to use them, making them into a carrier molecule, and for example, swine thyroglobulin, B-2 microglobulin, a HEMOSHI amine, an immunoglobulin, a toxin (a cholera toxin, a tetanus toxin, a diphtheria toxin, others), a polysaccharide, lipopolysaccharide, nature or synthetic polyadenylic acid and a polyuridylic acid, the poly alanyl and the poly lysine polypeptide, a cell membrane component, for example, formalin, or a glutaraldehyde processing erythrocyte cell membrane can be raised to such a compound. concrete -- for example, a carbodiimide and alkyl chloro carbonate -- the carboxyl group of this incomplete antigen is preferably combined with one of the reactant amino groups of the amount

**THIS PAGE BLANK (USP 19)**

support of macromolecules using a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride and isobutyl chloro carbonate.

[0011] B) [an immunization chemically-modified [ of mammalian ] degree, and this antibody acquisition process] Thus, in order to carry out immunity of the mammals, such as a mouse, a rat, a rabbit, and a dog, as opposed to the obtained complex, it is performed by administration beyond 1 time or it of complex, using the approach of well-known immunization. For example, there is no 7 and 2 or three administration will be desirable especially at intervals of 12 thru/or 16 days for 30 days. Injection which may be performed the inside of a vein and a peritoneal cavity or hypodermically is a desirable administration gestalt. Especially the combination of subcutaneous injection and the inside of a peritoneal cavity is still more desirable. In addition, complex is dissolved and used for the sodium system phosphate buffer solution containing one sort of adjuvants usually used, such as the suitable buffer solution (what mixed tubercular killed bacteria), for example, Freund's complete adjuvant etc., etc. in this case. Here, an adjuvant means the matter which reinforces the immunoreaction to the antigen nonspecific, when a medicine is prescribed for the patient with an antigen. And after leaving the above-mentioned mammalian, without [ 0.5 thru/or ] taking a measure for four months, one administration is already performed with the dose of the complex of 10microg thru/or 1000microg especially 25microg thru/or 500microg. The immune competence B cell which can produce the antibody to said complex by the usual approach is isolated from the mammalian which carried out immunization in three days of the last administration thru/or two months after, and the hybrid cell which unites with the tumor cell in which this immune competence B cell can carry out cell division continuously, and is generated is isolated. The monoclonal antibody (it is described as this antibody below.) which reacts to coplanar one PCB of this which has advanced singularity and compatibility specifically can be manufactured by choosing the hybrid cell which produces a desired antibody and cultivating the cloned cell in the living body (in vivo) within a test tube (in vitro). The number of association of chlorine differs from the joint location of the chlorine of each homolog and isomer coplanar [ PCB ], and this antibody is recognized.

[0012] C) [the measuring method using a monoclonal antibody]

As a measuring method using this antibody, immunity analysis coplanar [ by the indirect competitive inhibition method (the ELISA method), a direct noncompetitive inhibition method (the ELISA method), etc. / this / PCB ] can be raised. This analysis is analytical method with a high precision which can be processed simple and quickly.

[0013] A direct noncompetitive inhibition method can be performed by the following approaches. It makes coplanar one PCB in the free state fundamentally included in the 1st antibody (namely, this antibody) of the constant rate combined with solid-state supporting material, and a sample react. Next, it becomes the antigen of the first antibody in an unreacted condition, and this antibody (directly), Or by carrying out the quantum of the united above-mentioned antigen based on the indicator, after combining coplanar one PCB to which the indicator is given through the linker The amount of the first antibody (namely, this antibody) combined with coplanar one PCB of this in the free state included in a sample and the solid-state supporting material which reacted is computed, and the amount coplanar [ this / PCB ] in the free state included in a sample from this calculation value is measured.

[0014] When connecting indirectly through a linker, the linker used is a compound which contains in the freedom of the amount carrier molecule of macromolecules at least one sort which can form the covalent bond of an available reaction radical, or the reaction radical beyond it. For example, the compound which has one piece or a reaction radical beyond it, for example, the amino group, a carboxyl group, etc. as a reaction radical can be raised, including the cross-linking carbon molecule between two pieces and 16 pieces. Specifically, general formula  $H_2(CH_2)_nCOOH$  ( $n$  is an integer to two to 16 pieces) is raised as a desirable thing. The approach of combining the reaction radical of this incomplete antigen with one of the reaction radicals of the amount carrier molecule of macromolecules, and the same approach can be used.

[0015] An indirect competitive inhibition method can be performed by the following approaches. It is based on the contention coplanar [ PCB ] which is contention the antigen combined with solid-state supporting material, and coplanar [ in the free state included in a sample / PCB ], for example, the isolation antigen of the 1st antibody recognized by coplanar one PCB which is the antigen combined with solid-state supporting material, and the 2nd antibody to which the indicator is given, fundamentally. In relation to this, association coplanar [ PCB ] which is an antigen to solid-state supporting material may take place indirectly through the amount support of macromolecules which is not recognized by direct or the linker, and/or the 1st antibody (namely, this antibody). Here, the amount support of macromolecules which is not recognized by the 1st antibody (namely, this antibody) is the amount support of macromolecules which is not used in manufacture of the 1st antibody among the

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

amount support of macromolecules which can be used for a complete antigen (immunogen) chemically-modified [ above ] degree. Moreover, when combining indirectly coplanar one PCB which is an antigen through the amount support of macromolecules which is not recognized by the linker and/or the 1st antibody, the same approach as a complete antigen (immunogen) chemically-modified [ above ] degree or the approach of applying can be used for these association.

[0016] When connecting indirectly through a linker, the linker used is a compound which contains in the freedom of the amount support of macromolecules at least one sort or the reaction radical beyond it which can form the covalent bond of an available reactor. For example, the compound which has one piece or a reaction radical beyond it, for example, the amino group, a carboxyl group, etc. as a reaction radical can be raised, including the cross-linking carbon molecule between two pieces and 16 pieces. Specifically, general formula  $H_2(CH_2)_nCOOH$  ( $n$  is an integer to two to 16 pieces) is raised as a desirable thing.

[0017] As a solid-state supporting material used for direct or indirect association coplanar [ PCB ] which is an antigen, the front face of the split of the bead front face which consists of a microtiter plate or the plastics front face of a test tube, polystyrene, polypropylene, a polyvinyl chloride, glass, or plus TIKU, for example, a filter paper, a dextran, a cellulose, a nitrocellulose, or other similar ingredients etc. can be raised.

[0018] the amount carrier molecule of giant molecules which is not recognized by direct or the spacer, and/or the 1st antibody (this antibody) in coplanar one PCB which is an antigen by such solid-state supporting material -- minding -- joining together indirectly (it being described as coating below.) -- for example, solid-state supporting material is beforehand activated by the usual approach using glutaraldehyde or a cyanogen bromide. After adding coating liquid to the activated solid-state supporting material at a coating material, the coat of the front face is carried out by incubating with combination with the serum albumin of the mammalian of the same kind as the mammalian which produces the 1st antibody. As coating liquid used here, about 10 mM phosphate buffer solution (pH7.4) containing the sodium chloride of 140mM etc. can be raised, for example. coplanar one PCB which is an antigen as conditions for coating, or a linker -- and -- or the concentration in the coating liquid of the antigen which has the amount support of giant molecules which is not recognized by the 1st antibody can raise ml etc. as desirable conditions as an antigen in about 0.05microg/ml to about 1microg /. When using a 96 hole micro test plate as an amount to be used, for example, about 0.1ml / well extent can be raised as desirable conditions. Moreover, as coating conditions, about 4 degrees C and about 6 hours are not, and one evening can be raised preferably for 24 hours. As the above-mentioned concrete example, 96 hole microtiter plate made from polystyrene is used, for example as a solid-state supporting material. The serum albumin or the keyhole limpet hemocyanins of an animal, such as a cow, are used as an amount carrier molecule of macromolecules used for the complex (what combined coplanar one PCB with the amount support of macromolecules through the linker) for [ which makes the 1st antibody produce ] carrying out. Using the serum albumin of animals of another kind, such as a goat which is the amount carrier molecule of macromolecules which is not recognized by the 1st antibody as an amount carrier molecule of macromolecules used in case it combines with solid-state supporting material indirectly, can raise. In addition, although it combined with the amount support of giant molecules the serum albumin of the mammalian of the same kind as mammalian and coplanar one PCB which produce the 1st antibody through the linker, in order to prevent nonspecific association of the 1st antibody after coating to the support of complex It is desirable to block the part to which the serum albumin of the mammalian of the same kind as the mammalian which produces the 1st antibody, and the mammalian which produces the 1st antibody in proteins other than the serum albumin of the mammalian of the same kind is not sticking. The approach of incubating for example, a skim milk solution and support around about 20 degrees C about 3% for about about 2 hours etc. is raised to this purpose as a simple thing. Thus, the obtained support is used after the washing buffer solution (for example, 0.15M sodium chloride content 10mM phosphate buffer solution pH7.4 which contained tween20 0.05%) washes.

[0019] Thus, coplanar one PCB combined with the solid-state supporting material obtained directly or indirectly is mixed with the testing liquid which contains next coplanar one PCB which is the antigen which is contained in a sample, and which should be detected, and the 1st antibody (this antibody), and this mixture incubates. In addition, coplanar one PCB which is the antigen which is contained in a sample, and which should be detected is the gestalt of isolation in this case, or may exist as the environment of water or crops, soil, food, etc., or a component in a biological material. It incubates with the 2nd antibody by which the indicator was carried out in about 10 minutes thru/or after incubation of about 2 hours with the enzyme which mixture recognizes the 1st antibody and is combined. As the 2nd antibody by which the indicator was carried out, the antibody to the 1st antibody (this antibody) which combined enzymes, such as a peroxidase, alkaline phosphatase, beta-D-

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

galactosidase, glucose oxidase, glucoamylase, carbonic acid anhydrase, acetylcholineesterase, a lysozyme, a malate dehydrogenase, a glucose-6-phosphate dehydrogenase, and an urease, can be raised with this enzyme etc., for example. As a concrete example, when using rabbit antiserum as the 1st antibody (this antibody), the anti-rabbit immunoglobulin (IgG) goat immunoglobulin (IgG) which combined the peroxidase as the 2nd antibody can be raised as a suitable thing. In addition, this rabbit IgG goat IgG is marketed and is easily available. the case where an indicator is carried out by the peroxidase -- as a substrate -- as a hydrogen peroxide and a color reagent -- diaminobenzidine -- or -- O-phenylenediamine and \*\*\*\*\* -- brown or yellow is produced. When an indicator is carried out by glucose oxidase, they are 2 and 2'-acid-G (3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) etc. is used.) as a substrate. In addition, it measures using equipments, such as a multi-scanning spectrophotometer, by making into an absorbance coloring produced by the enzyme reaction of the marker enzyme and the substrate which were combined with the 2nd antibody.

[0020] In addition, the fluorochrome is beforehand combined with the 2nd antibody in addition to the above-mentioned enzyme, and it can consider as a measuring method with more high sensibility by the antigen-antibody reaction by measuring the united amount of antibodies not by enzyme activity but by fluorescence intensity.

[0021] Moreover, the means for the immunological detection and analysis of this coplanar PCB \*\* made into the gestalt of the trial kit which fits the use under field conditions for high detection and analysis of the precision which contains at least one sort of this antibody as a reagent, and can be processed quickly simple [ coplanar one PCB of this ] as use of this antibody can also be raised. The above-mentioned trial kit may contain the following constituent. : coplanar one PCB which is (1) antigen -- direct or a linker -- and -- or the solid-state object supporting material which carries out indirect association through the amount carrier molecule of macromolecules which is not recognized by the 1st antibody (this antibody) -- (2) The 1st antibody (this antibody) coplanar [ this / PCB ] of a standard solution (4) which is a reagent (3) antigen containing this invention antibody is recognized. And additives, such as a polypeptide, a surfactant, etc. which prevent formation of the reagent containing the 2nd antibody by which the indicator was carried out by an enzyme or a fluorochrome etc. to combine, (5) buffer solutions, (6) nonspecific adsorption, and floc, and (7) pipets, a reaction container, a count curve, etc. The above-mentioned solid-state supporting material can have a very wide range design, and can have a configuration which is very different according to the specific purpose meant on the occasion of use. For example, a pan, a ball, a plate, a small rod, a cel, a small bottle, a small tube, a fiber, a network, etc. can be raised. As a concrete example, the microtiter plate which consists of transparence plastic material, for example, a polyvinyl chloride, or polystyrene, the corpuscle which consists of polystyrene, a tube, or a rod is usable.

[0022] By the above-mentioned approach, when making the drainage systems in the environment of paddy field water, tap water, etc. into a sample, it can measure coplanar one PCB in a sample. Therefore, from the above, when the concentration coplanar [ PCB ] in a sample is high concentration, after it dilutes a sample suitably, it uses it. When making the non-drainage systems in the environment of oil (chemical treatment oil etc.) crops, soil, food, etc., or a living body's sample into a sample, after extracting this coplanar PCB \*\* from solvent samples, such as a methanol, or making it stick to a suitable solid phase base material, it is used after this coplanar PCB \*\* from a base material from a solid phase base material using a suitable organic solvent etc. by the suitable approach. Thus, it is made to react by mixing the buffer solution (or water solution) containing the organic solvent containing prepared coplanar one PCB of this, for example, incubating around about 20 degrees C overnight. Under the present circumstances, the 1st antibody (this antibody) is diluted to about 3,000 - a 5,000 times as many abbreviation as this, it is desirable to make it react with coplanar one PCB of this in a sample, and the concentration which is especially about 5,000 times can be raised as desirable conditions. That is, it is desirable to mix with the sample liquid containing coplanar one PCB of this of this dosage, and to make the 1st antibody diluted to about about 2,500 times react at about 20 degrees C overnight. As a diluent, the thing of the same presentation as the aforementioned washing buffer solution can be used, for example. In addition, it is desirable as protection protein to add skim milk etc. because of stabilization when the 1st antibody is diluted superfluously if needed.

[0023] The reaction combined with the solid-state supporting material which coated the front face with complex with the serum albumin of the same kind as the sample prepared as mentioned above and the mammalian which produces the 1st antibody for the 1st unreacted antibody contained in the reaction mixture of the 1st antibody is performed. It can raise desirably adding the reaction mixture of a sample and the 1st antibody to solid-state supporting material, for example, making it react at about 20 degrees C about this reaction condition for about about 1 hour. After a reaction, after the aforementioned washing buffer solution washes support, a reaction with

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



the antibody (the 2nd antibody) to the 1st antibody originating in the mammalian of a different kind from the mammalian which an indicator is carried out with an enzyme etc. and produces the 1st antibody is presented. [0024]

[Example] Hereafter, an example is given and this invention is explained. It cannot be overemphasized that this invention is not limited only to the following example.

[0025] [Example 1] Example 1 of production manufacture of the immunogen Preparation of complex (connection of the amount carrier molecule of macromolecules to the antigen combined with the connection and solid-state supporting material of the amount carrier molecule of macromolecules of a complete antigen (immunogen) chemically-modified degree)

[Preparation of the complex for anti-PCB-#77 antibody production] After protecting the hydroxyl group of 4-BUROMO-2-chlorophenol with methyl ether, by the Grignard-cross coupling reaction with 3 and 4-dichloro iodobenzene, 3, 3', and a 4-TORIKURORO-4' methoxy biphenyl were compounded, and 3, 3', and a 4-TORIKURORO-4' hydroxy biphenyl were obtained by carrying out deprotection of the methyl ether radical to a hydroxyl group by 3 bromination boron. 6-(3, 3', and 4-TORIKURORO biphenyl-4'-oxy-) hexanoic acid was compounded with 44% of overall yields at five processes by making 6-BUROMO hexanoic acid and ethyl ester react to this, and hydrolyzing ethyl ester to a carboxylic acid. After association to carrier protein used the carboxylic acid as the activity ester object with hydroxysuccinimide, it made the amino group and amide association form, and created the conjugate which combined PCB-#77.

4-BUROMO-2-phenol \*\*4-BUROMO-2-chloro anisole \*\*3, 4-dichloro iodobenzene \*\*3, 3', 4-TORIKURORO-4' methoxy biphenyl \*\*3, 3', 4-TORIKURORO-4' hydroxy biphenyl \*\*6-ethyl - 3 and 3' -- 4-TORIKURORO biphenyl-4'-oxy-hexanoate \*\*6-(3, 3', and 4-TORIKURORO biphenyl-4'-oxy-) hexanoic-acid \*\*6-N-hydroxysuccinimide-(3, 3', and 4-TORIKURORO biphenyl-4'-oxy-) hexanoate [0026] [Preparation of the complex for anti-PCB-#126 antibody production] After protecting a hydroxyl group by the methyl ether radical like composition of conjugate #PCB-77, By the Grignard-cross coupling reaction with 3, 4, and 5-TORIKURORO iodobenzene The 3, 3', 4, and 5-tetra-chloro-4' methoxy biphenyl was compounded, and the 3, 3', 4, and 5-tetra-chloro-4' hydroxy biphenyl was obtained by 3 bromination boron by carrying out deprotection of the methyl ether radical to a hydroxyl group. 6-(3, 3', 4, and 5-tetra-chloro biphenyl-4'-oxy-) hexanoic acid was compounded with 35% of overall yields at five processes by making 6-BUROMO hexanoic acid and ethyl ester react to this, and hydrolyzing ethyl ester to a carboxylic acid. After association to carrier protein used the carboxylic acid as the activity ester object with hydroxysuccinimide, it made the amino group and amide association form, and created the conjugate which combined PCB-#126.

3, 4, 5-TORIKURORO iodobenzene \*\*3, 3', 4, 5- tetra--- chloro-4' methoxy biphenyl \*\*3, 3', 4, and 5- tetra--- chloro-4' hydroxy biphenyl \*\*6-ethyl-(3, 3', 4, and 5-tetra-chloro biphenyl-4'-oxy-) hexanoate \*\*6- (3, 3', and 4 --) 5-tetrapod chloro biphenyl-4'-oxy-hexanoic-acid \*\*6-N-hydroxysuccinimide-(3, 3', 4, and 5-tetra-chloro biphenyl-4'-oxy-) hexanoate [0027] [Preparation of the complex for anti-PCB-#169 antibody production] by being among dioxane about 2 and 6-dichlorophenol, and making an equivalent dioxane dibromide complex react After compounding 4-BUROMO -2 and 6-dichlorophenol and protecting a hydroxyl group by the methyl ether radical like composition of KOJU gate #PCB-77 hereafter, by the Grignard-cross coupling reaction The 3, 3', 4 and 5, and 5'-PENTA chloro-4' hydroxy biphenyl was obtained. 6-(3, 3', 4 and 5, and 5'-PENTA chloro biphenyl-4'-oxy-) hexanoic acid was compounded with 23% of overall yields at six processes by making 6-BUROMO hexanoic acid and ethyl ester react to this, and hydrolyzing ethyl ester to a carboxylic acid. After association to carrier protein used the carboxylic acid as the activity ester object with hydroxysuccinimide, it made the amino group and amide association form, and created the conjugate which combined PCB-#169.

4-BUROMO -2, 6-dichlorophenol \*\*4-BUROMO -2, 6-dichloro anisole \*\*3, 3', 4 and 5, 5'-PENTA chloro-4' methoxy biphenyl \*\*3, 3', 4 and 5, 5' - PENTA chloro-4' hydroxy biphenyl \*\*6-ethyl - (3, 3', 4 and 5, and 5'-PENTA chloro biphenyl-4'-oxy-) hexanoate \*\*6-(3, 3', 4 and 5, and 5'-PENTA chloro biphenyl-4'-oxy-) hexanoic-acid \*\*6-N-hydroxysuccinimide - (3, 3', and 4 and 5 --) 5'-PENTA chloro biphenyl-4'-oxy-hexanoate

[0028] [Example 2] Example 2 of immunization manufacture An immunization chemically-modified [ of mammalian ] degree and this antibody acquisition process bovine serum albumin were dissolved in distilled water, it applied to PD-10 column made to equilibrate with a phosphate buffer solution (pH8.0), and the phosphate buffer solution (pH8.0) performed expansion elution. It is in a phosphate buffer solution (pH8.0) by this actuation. Bovine serum albumin was obtained. The solution which added 0.5ml dimethylformamide (DMSO) for 3.88mg (10micromol, 1:40Eq) to 16.7mg bovine serum albumin / 0.5ml phosphate buffer solution (pH8.0), and dissolved the conjugate obtained by the example 1 of manufacture in it was added, and one evening was put at 4 degrees C after stirring

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

for 30 seconds with the room temperature. It applied to PD-10 column which equilibrated each reaction mixture by phosphate buffered saline, and expansion elution was performed by phosphate buffered saline. The number of installation to the conjugate of the PCB derivative for which it asked from spectrometry is ten to 16 molecule per bovine-serum-albumin 1 molecule, and about 30 - 50% of the amino group in which the installation in a bovine-serum-albumin molecule is possible was used for association. A maximum of 8 - 9 times of immunity was performed using six Balb/C mouse 1 groups (7 weeks old, female) by 100micro g/mouse of first time, and following 50microg/mouse about each immunogen. In addition, antigens are an adjuvant and the emulsified thing and the administration root was prescribed for the patient intraperitoneal [ of a mouse ], and into the foot pad.

[0029] [Example 3] To the mouse with which the specific antibody production to the check of anti-PCB serum antibody production and the production hapten of a hybridoma cell was checked, antigen conjugate was extracted in the caudal vein, the spleen was extracted administration and three days after, and the spleen cell was prepared to it. a myeloma cell (P3-X63/Ag.8) and a spleen cell are set to 1:5 -- as -- mixing -- a polyethylene glycol (PEG) -- cell fusion was performed in law. A cell is made to suspend in the 10% fetal-calf-serum content RPMI1640 culture medium of HAT addition, seeding is carried out to the micro test plate for 96 hole culture so that it may become 2 - 5x10<sup>5</sup> cells/well, and it cultivates on carbon dioxide gas and 37-degree C conditions 5%. From culture initiation, it screened using the culture supernatant of the well as which culture-medium exchange was performed on four - the 5th, and growth of a clone was regarded till a maximum of the 1 week -10 day 1st month.

[0030] [Example 4] Evaluation of a monoclonal antibody; measurement 1. of PCB by competitive inhibition ELISA (screening of the antibody forming cell by the ELISA method)

After adding and stirring DMSO of 300microl to hydroxysuccinimide ester 0.02mmol of a PCB derivative, and biotin-hydrazide 0.024mmol, it is made to react for room temperature 16 hours. The purification biotin indicator PCB was prepared after reaction termination by Opposition HPLC (ODS-80T column: for [ TOSOH and solvent:PCB-#77:72% acetonitrile linear, PCB-#126:80% acetonitrile linear, PCB-#169:90% acetonitrile linear, and part / for // and rate-of-flow:2ml cycle / 1 / : ] 40 minutes). PBS -- anti-mouse IgG antibody prepared [ ml ] in 10microg /by (- [the phosphoric-acid buffer physiological salt solution which does not contain calcium magnesium]) after it adds 50microl and 37 degrees C incubates for 1 hour -- the 0.05%tween20 addition PBS (-) -- (it abbreviates to a "penetrant remover" below.) -- each hole of 96 hole microtiter plate was washed 3 times. Gelatin (product made from BIO-RAD) 300microl prepared to 1% by PBS (-) was added to this, and it was left at the room temperature for 2 hours (blocking). After washing this 96 hole microtiter plate 3 times by the above-mentioned penetrant remover, the culture medium (supernatant liquid) of a hybrid cell was added by 50microl / well to this, and it reacted at the room temperature for 1 hour. After washing this 96 hole microtiter plate 3 times again, the biotin indicator PCB prepared to 0.8microM in DMSO 50% and the non-indicator PCB (PCB-#77, PCB-#126, PCB-#169) prepared to 0.01microM, 0.1microM, and 1microM in DMSO 50% are added every [ 25micro / l ], and is carried out after a room temperature 1-hour reaction. Peroxidase-labeling streptoavidin (product made from Amasham) 50microl of marketing which diluted the well with the above-mentioned penetrant remover 1,000 times by 0.1% gelatin-PBS (-) after 3 times washing was added, and each well was washed 3 times by the above-mentioned penetrant remover after the room temperature 1-hour reaction. Substrate solution [3, 3', 5, and 5'-tetramethylbenzidine substrate system:KPL] 50microl was added, and it was made to color by incubating for 15 minutes at a room temperature. And by adding the equivalent phosphoric acid of 1M, the enzyme reaction was suspended and the absorbance (contrast wavelength of 655nm) in 450nm was measured for coloring of each well of a microtiter plate using the multi-scanning spectrophotometer (thing make [ tech / titer ] or equivalent). a well with high extent which makes 100% the absorbance under non-indicator PCB nonexistence (under 50%DMSO existence), and checks coloring by the enzyme reaction under non-indicator PCB existence -- PCB -- it considered as the specific antibody production well.

[0031] 2. (cloning of an antibody forming cell)

Cell cloning was carried out for the antibody production well specified as mentioned above by limiting dilution. The cloning cell which is producing the antibody was obtained as a result of cell cloning. The obtained cloning cell was cultivated under 5% carbon dioxide gas and 37-degree-C conditions by the culture medium which contains fetal calf serum 10%, and the culture medium was used as the antibody solution. Furthermore, this antibody was obtained by affinity chromatography's refining this antibody solution and dialyzing the obtained protein fractionation by PBS (-). Reactivity was investigated by the approach indicated in the example 4 about the monoclonal antibody originating in the hybridoma which cloned using the antibody which refined the culture

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

supernatant. Moreover, the suitable combination (the class and concentration of an indicator object) of the effect of the anti-mouse IgG (Fc recognition) antibody at the time of the formation of anti-PCB antibody solid phase, the effect of Tween20 in the reaction mixture in a trial system (selection of optimum concentration), and the anti-PCB antibody, an indicator object and a contention object was determined in this process. The antibody which suited the purpose was chosen under the test condition acquired as a result. As PCB-#77 system of measurement, as antibody 8-5B-12B (it is used by biotin indicator PCB-#77:1.6x10<sup>-7</sup>M), and PCB-#126 system of measurement As antibody 4-6B-19F (it is used by biotin indicator PCB-#77:8x10<sup>-7</sup>M), and PCB-169 system of measurement, antibody 7-3C-4C (it is used by biotin indicator PCB-#169:1.3x10<sup>-7</sup>M) was chosen. Antibody 8-5B-12B is a monoclonal antibody which hybridoma PCB77-B (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology deposition FERM P-17098) produces. Antibody 4-6B-19F are a monoclonal antibody which hybridoma PCB77-A (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology deposition FERM P-17097) produces. Antibody 7-3C-4C is a monoclonal antibody which hybridoma PCB169-E (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology deposition FERM P-17099) produces.

[0032] The standard curve coplanar [ PCB ] was shown in drawing 1 -3. When inhibition is made into the limit-of-detection value of antigen concentration 20%, the limit-of-detection value under these conditions of each system of measurement In PCB-#77 system of measurement, in 8.08x10<sup>-8</sup>M (it is limit-of-detection value:0.59ng per considerable and assay system to 23.0ppb), and PCB-#126 system of measurement In 2.10x10<sup>-8</sup>M (it is limit-of-detection value:0.17ng per considerable and assay system to 6.85ppb), and PCB-#169 system of measurement, it was 1.22x10<sup>-8</sup>M (it is limit-of-detection value:0.11ng per considerable and assay system to 4.40ppb).

[0033] [Example 5] In the real samples (waste oil, environmental sample, etc.) made into the measuring object, the reactivity (check of the singularity of this antibody) PCB of PCBs other than the measuring object, and this invention antibody Since it is presumed that isomers other than PCB made into the measuring object live together, in evaluation of the singularity of an antibody The form reflecting the situation that not only the comparison of the cross-reactivity according to isomer individual but measurement of the purpose PCB under PCB isomer coexistence by the real sample is called for estimated the singularity of an antibody.

[0034] \*\* About singularity evaluation anti-PCB-#of anti-PCB-#77 antibody (8-5B-12B) 77 antibody (8-5B-12B), as shown in drawing 4 , in order to see cross-reactivity with the mixture (Table 1) of the PCB isomer with which cross-reactivity is expected, the preliminary test was performed beforehand.

[0035]

[Table 1]

交差反応性評価化合物のグループ別一覧

Group No.	交差反応性検討に用いた化合物群
1	PCB-#77
2	PCB-#126
3	PCB-#169
4	PCB-#1,-#2,-#3
5	PCB-#5,-#9,-#12,-#14
6	PCB-#4,-#6,-#8
7	PCB-#11,-#13,-#15
8	PCB-#21,-#29,-#38
9	PCB-#20,-#26
10	PCB-#33,-#35,-#37
11	PCB-#78,-#81
12	PCB-#127
13	Biphenyl
14	2-Hydroxybiphenyl

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

[0036] From this result, although the cross-reactivity of PCB-#126 was accepted, it was judged to be a unique antibody by PCB-#77. For this reason, the effect which it has on the antigen-antibody reaction of anti-PCB-#77 antibody (8-5B-12B) and PCB-#77 under PCB-#126 existence further was considered. Consequently, as shown in drawing 5, when the amount of mixture of PCB-#126 was 10 or less times, it was thought that there was little effect on a measurement result.

[0037] \*\* About singularity evaluation anti-PCB-#of anti-PCB-#126 antibody (4-6B-19F) 126 antibody (4-6B-19F), as shown in drawing 6 like \*\*, in order to see cross-reactivity with a PCB isomer, the preliminary test was performed. Although the reactivity of PCB-#126 was the highest, cross-reactivity was accepted to be also PCB-#77 and a group 11 (mixture of PCB-#78 and PCB-#81). then, PCB-#77, PCB-#78, PCB-#81, and PCB-#169 mixture -- the first -- concentration  $1 \times 10^{-6} \text{M}$  -- It adjusted to  $1 \times 10^{-7} \text{M}$ , equivalent PCB-#126 were mixed and measured by the density range (first concentration) of  $2 \times 10^{-7} \text{M}$  -  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ , and the effect which it has on the antigen-antibody reaction of anti-PCB-#126 antibody (4-6B-19F) and PCB-#126 was considered. This result is shown in drawing 7. According to the system of measurement of PCB-#126, when the amount of mixture was 5 or less times, it was thought that there was almost no effect of mixture.

[0038] \*\* About singularity evaluation anti-PCB-#of anti-PCB-#169 antibody (7-3C-4C) 169 antibody (7-3C-4C), as shown in drawing 8 like \*\* and \*\*, it is the purpose which sees cross-reactivity with a PCB isomer, and the preliminary test which sees cross-reactivity with a PCB isomer was performed. Cross-reactivity with PCB-#126 and the group 11 (mixture of PCB-#78 and PCB-#81) of what has the highest reactivity of PCB-#169, and a group 12 (PCB-#127) was accepted. Then, PCB-#77, PCB-#126, group 11 (PCB-#78, isoconcentration mixture of PCB-#81), and group 12 (PCB-#127) mixture was measured under coexistence by  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  and  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  concentration. Consequently, although there is little effect on a measurement result if the amount of mixture of PCB in which it may interfere to the existence of PCB-#169 of ppb level is 2 double less or equal in PCB-#169 system of measurement as shown in drawing 9, a forward error is given to measured value above the amount of 10 times.

[0039] [Example 6] Solvent resistance of an antibody (dimethyl sulfoxide and methanol)

The resistance to dimethyl sulfoxide (DMSO) was investigated by the contention ELISA method shown in the law using each antibody chosen in the example 4. DMSO was added so that the last concentration contained in the solution at the time of a competitive reaction might become 50% from 10% respectively. The effect of DMSO [ in / for the effect of DMSO / in / for the effect of DMSO in PCB-#77 antibody / PCB-#126 antibody / PCB-#169 antibody ] is shown in drawing 10 at drawing 12 at drawing 11. By PCB-#77 antibody of drawing 10, although PCB-#77 concentration was accepted for the fall of a reaction value at the high concentration side, as the concentration of DMSO showed drawing 12 from drawing 10 on 30% or less of conditions, by other systems, the upward tendency of measuring range and detection sensitivity was accepted by lowering the concentration of DMSO. Moreover, although not shown in drawing, the concentration of DMSO hardly accepted reactivity at 70% or more. Although the last concentration of DMSO fell in this monoclonal antibody and sensitometry fell at 50% from the above result, it became clear that each PCB can be measured.

[0040] The coplanar PCB biotin indicator object changed into the solution condition was made into the sample by dissolving with the buffer solution which contains 50%, 70%, and 90% by making concentration of a methanol into the last concentration about the methanol (methyl alcohol) resistance of this antibody similarly. Although, as for anti-PCB-#126 antibody (4-6B-19F) and anti-PCB-#77 antibody (8-5B-12B), inhibition of a reaction was accepted at the 70% or more of the last concentration of a methanol, as for the analysis using each antibody, the reaction was accepted at 50%. Therefore, in the range of 0 - 50% of concentration of a methanol, these antigen-antibody reactions were possible enough. Furthermore, since the reaction was accepted also with the methanol 70%, in the range of 0 - 70% of concentration of a methanol, anti-PCB-#169 antibody (7-3C-4C) of the effect to an antigen-antibody reaction was slight, and was able to be measured enough.

[0041]

[Effect of the Invention] By this invention approach, it made it possible to offer coplanar one PCB and the monoclonal antibody which reacts specifically with toxic PCB-#77 [ high ], PCB-#126, and PCB-#169 specially especially in it, and holds the property in an organic solvent (a methanol, dimethyl sulfoxide). This especially antibody enabled high analysis of the precision which can be processed quickly simple in analysis of the sample which needs pretreatment of an organic solvent extract in analysis of the environment of oils (chemical treatment oil etc.), soil, water, food, etc., or this compound in a biological material.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



[Translation done.]

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 公 開 特 許 公 報 ( A )

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-191699  
( P2000-191699A )

(43) 公開日 平成12年 7 月11日 (2000. 7. 11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S 4 B 0 6 4
	33/577	33/577	B 4 B 0 6 5
// C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
	15/02	C 1 2 N 5/00	B
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 12 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平10-373369	(71) 出願人	594021795 帝人エコ・サイエンス株式会社 東京都千代田区霞ヶ関 3 丁目 5 番 1 号
(22) 出願日	平成10年12月28日 (1998. 12. 28)	(72) 発明者	三浦 一伸 京都府長岡京市神足 2 丁目20-12
		(72) 発明者	片岡 千和 京都府京都市山科区小山姫子町14- 3 エ クセレント林201
		(72) 発明者	坂木 純子 大阪府三島郡島本町水無瀬 2 - 8 - 2 - 606
		(74) 代理人	100077263 弁理士 前田 純博
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 50 ( v / v ) % 有機溶媒水溶液においてもその抗原認識特性が実質的に低下しないコブラナー P  
C B に特異的に反応するモノクローナル抗体及びその測定方法

(57) 【要約】

【課題】 コブラナー P C B に特異的に反応するモノク  
ローナル抗体及びそれをを用いた油性検体中のコブラナー  
P C B の測定法。

【解決手段】 コブラナー P C B を認識するモノクロー  
ナル抗体であって、 50 ( v / v ) % 有機溶媒水溶液中でも抗  
原認識特性が実質的に低下しないモノクローナル抗体及  
びそれをを用いた油性検体中のコブラナー P C B の測定方  
法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 コブラナーPCBを認識するモノクローナル抗体であって、50 (v/v)%有機溶媒水溶液中でも抗原認識特性が実質的に低下しないモノクローナル抗体。

【請求項2】 コブラナーPCBが3, 4, 3', 4'-テトラクロロビフェニル(PCB-#77)、3, 4, 5, 3', 4'-ペンタクロロビフェニル(PCB-#126)または3, 4, 5, 3', 4', 5'-ヘキサクロロビフェニル(PCB-#169)である請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 有機溶媒水溶液又は有機溶媒を含まない緩衝液(水溶液を含む)に存在するコブラナーPCBを請求項1または2記載のモノクローナル抗体と接触させて抗原抗体複合体を形成させ、該複合体の形成量を測定することを特徴とするコブラナーPCBの測定方法。

【請求項4】 コブラナーPCBを含有する油性検体に有機溶媒を接触させて、油性検体中のコブラナーPCBを有機溶媒中に抽出し、該有機溶媒中のコブラナーPCBをモノクローナル抗体を用いて測定し、そして油性検体中のコブラナーPCBに換算することを特徴とする、油性検体中のコブラナーPCBの測定方法。

【請求項5】 モノクローナル抗体が請求項1～2記載のいずれかのモノクローナル抗体である請求項4記載の油性検体中のコブラナーPCBの測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、コブラナーPCBに特異的に反応するモノクローナル抗体及びそれを用いた油性検体中のコブラナーPCBの測定方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】PCBはその毒性から、カネミ油症事件などヒトに対する被害を与えてきており、化学物質の審査及び製造等に関する法律の第1種特定化学物質に指定され製造、使用等が禁止されている。しかし、PCBはダイオキシン類とともに焼却により非意図的に生成され、かつ、難分解性で生物体内に蓄積されることから、ヒト及び野生生物に大きな影響を及ぼす危険性を有している。さらに、近年、PCBは、いわゆる環境ホルモン(内分泌攪乱物質)としての疑いの強い化学物質とされ注目されている。このような状況から、多種類の同族体、異性体を持つPCBのなかで、特に生物に対して高い毒性を有するコブラナーPCBの測定は重要である。従来、このようなPCBを含有する油(特に化学処理油)、土壌、水質、食品等の環境中または生体試料中の試料分析には、主としてガスクロマトグラフィー法または高速液体クロマトグラフィー法が採用されてきた。しかしながら、該分析方法では、試料のクリーンアップ等の調製に相当の手間と時間を必要とすること並びに測定装置や設備等に高額な費用を要することとともに、該技

術者も教育、訓練が必要であるという問題があった。また、PCBの分析は分析件数が多大であるため、簡便性、迅速性が重要であり、特に測定現場(オンサイト)における分析法の開発が待望されていた。そこで、簡易分析法として、酵素免疫法が開発された。しかし、従来の酵素免疫法に使用する報告されているモノクローナル抗体は、本発明で述べる抗体のような有機溶媒存在下において抗原認識特性を保持できないため、PCBを試料中より有機溶媒抽出する場合、酵素免疫法による定量には必ずしも満足いくものではないのもであり、有機溶媒に耐性を持つモノクローナル抗体が期待されていた。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】そこで、抗体を用いた免疫学的検出方法によるPCBの簡易、迅速な分析方法の確立を試みた。該免疫学的検出方法において、最も重要な因子は、コブラナーPCBに特異的に反応する抗体であるが、コブラナーPCBの測定対象が環境水、及び土壌、生体試料等から有機溶媒でPCBを抽出した場合は有機溶媒、油分中のコブラナーPCBである場合もあるので、PCBの測定が水系溶媒以外に有機溶媒存在下でも測定可能であることが必要である。そのような測定系でも抗原認識特性が高い抗コブラナーPCBモノクローナル抗体を得ることが必要であった。

【0004】モノクローナル抗体の有機溶媒耐性は、抗体の抗原認識の工程に必要であり、酵素免疫法の次の工程である酵素反応工程においては緩衝液(水溶液)で行われるため、酵素反応時には、上記のモノクローナル抗体の有機溶媒耐性は必要ない。ただし、該有機溶媒存在下で、酵素標識抗体の酵素活性に影響を与えないことはいうまでもない。

【0005】なお、当該抗体に酵素を標識する代わりに蛍光色素を標識することで、酵素を標識する場合と同様に対象物質を測定することができる。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、(1)コブラナーPCBを認識するモノクローナル抗体であって、50 (v/v)%有機溶媒水溶液中でも抗原認識特性が実質的に低下しないモノクローナル抗体、(2)コブラナーPCBが3, 4, 3', 4'-テトラクロロビフェニル(PCB-#77)、3, 4, 5, 3', 4'-ペンタクロロビフェニル(PCB-#126)または3, 4, 5, 3', 4', 5'-ヘキサクロロビフェニル(PCB-#169)である上記(1)記載のモノクローナル抗体、(3)有機溶媒水溶液又は有機溶媒を含まない緩衝液(水溶液を含む)に存在するコブラナーPCBを上記(1)または(2)記載のモノクローナル抗体と接触させて抗原抗体複合体を形成させ、該複合体の形成量を測定することを特徴とするコブラナーPCBの測定方法、(4)コブラナーPCBを含有する油性検体に有機溶媒を接触させて、油性検体中のコブラナーPCBを有機溶

媒中に抽出し、該有機溶媒中のコブラナーPCBをモノクローナル抗体を用いて測定し、そして油性検体中のコブラナーPCBに換算することを特徴とする、油性検体中のコブラナーPCBの測定方法、及び(5)モノクローナル抗体が上記(1)又は(2)記載のいずれかのモノクローナル抗体である上記(4)記載の油性検体中のコブラナーPCBの測定方法、である。

【0007】本発明のモノクローナル抗体は、コブラナーPCBをリンカーを介して高分子量担体に結合せしめた複合体を抗原として哺乳動物を免疫した後、該哺乳動物から前記複合体に対する抗体を産生することのできる免疫適格B細胞を出現させ、該免疫適格細胞を連続的に細胞分裂し得る腫瘍細胞に融合してハイブリッド細胞を生成し、該ハイブリッド細胞からコブラナーPCBに有機溶媒存在下でも水系溶媒と実質的に同等に特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを単離し、該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を精製、単離することにより得ることが出来る。

【0008】本発明のモノクローナル抗体を用いたコブラナーPCBの測定方法は、従来公知の免疫測定方法に本発明のモノクローナル抗体の特徴を踏まえた改良を加えることにより、構成することが出来る。

【0009】

【発明の実施の形態】コブラナーPCBのうちで特に高い毒性を有するものとしては、例えば、PCB-#126、PCB-#77、PCB-#169等の化合物をあげることができる。したがって、上記の3化合物に対するモノクローナル抗体の製造方法で代表して説明する。本発明によって得られた抗PCB-#77抗体、抗PCB-#126抗体、抗PCB-#169抗体のアイソタイプはいずれもIgGであった。また、得られた抗コブラナーPCBモノクローナル抗体を用いて、コブラナーPCBを測定する場合は、そのIgGまたは、そのフラグメント、一例をあげるとF(a' b)<sub>2</sub>を使用する。

【0010】A)【コブラナーPCBの完全抗原(免疫原)化工程】

対象とするコブラナーPCBをリンカーを介して高分子量担体分子に結合することにより、抗原性を有する複合体とすることができる。用いられるコブラナーPCBは、純度が高いものが好ましい。用いられる高分子量の担体分子はコブラナーPCB(不完全抗原)にリンカーを導入した化合物との連結反応に自由に利用され得る反応基を有し、かつ該不完全抗原に連結されることにより、それに免疫原性を付与し得るか、または、既に存在するそれらの免疫原性を高め得る巨大分子化合物であればよい。特に、自由に利用可能な反応性アミノ基を含む巨大分子化合物が好ましい。例えば、分子量が約1万から15万の間のリジン(lysine)に富む蛋白質等をあげることができる。具体的には、ウシ血清アルブミン(BSA:分子量 66200)、ヒト血清アルブミン(HS

A:分子量 58000)、ウサギ血清アルブミン(RSA:分子量 68000)、ヤギ血清アルブミン(GSA:分子量 68000)、オボアルブミン(卵白アルブミン:分子量45000)、または、キーホールカサガイヘモシアニン(KLH:分子量1000000)等があげられる。その他の巨大分子化合物が上記の要求を満たせば、それらを担体分子として、使用することは可能であり、そのような化合物には、たとえばブタチログロブリン、B2ミクログロブリン、ヘモシアミン、免疫グロブリン、毒素(コレラ毒素、破傷風毒素、ジフテリア毒素その他)、多糖、リボ多糖、天然または合成ポリアデニル酸およびポリウリジル酸、ポリアラニルおよびポリリジンポリペプチド、または、細胞膜成分たとえばホルマリンまたはグルタルアルデヒド処理赤血球細胞膜等をあげることができる。具体的には、例えば、カルボジイミド、アルキルクロロカーボネイト、好ましくは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、イソブチルクロロカーボネイトを用いて該不完全抗原のカルボキシル基を高分子量担体の反応性アミノ基の1つに結合させる。

【0011】B)【哺乳動物の免疫感作化工程および本抗体取得工程】

このようにして得られた複合体に対して、たとえばマウス、ラット、ウサギ、イヌ等の哺乳動物を免疫するには、公知の免疫感作の方法を用いて、例えば、複合体の1回またはそれ以上の投与により行われる。たとえば7ないし30日、特に12ないし16日間隔で2または3回の投与等が好ましい。静脈内、腹腔腔内もしくは皮下に行われ得る注射が好ましい投与形態である。さらに皮下注射と腹腔腔内との組み合わせが特に好ましい。なお、この場合、複合体は適当な緩衝液、たとえばフロイントの完全アジュバント(結核死菌を混合したもの)等の通常用いられるアジュバントの1種を含有するナトリウム系リン酸緩衝液等に溶解して用いられる。ここで、アジュバントとは抗原とともに投与したとき、非特異的にその抗原に対する免疫反応を増強する物質を意味する。そして、上記の哺乳動物を0.5ないし4ヶ月間処置せずに放置した後、たとえば10μgないし1000μg、特に25μgないし500μgの複合体の投与量でもう1回の投与が行われる。最後の投与の3日間ないし2ヶ月間後に免疫感作した哺乳動物から通常の方法により前記複合体に対する抗体を産生することができる免疫適格B細胞が単離され、該免疫適格B細胞が連続的に細胞分裂し得る腫瘍細胞と融合され生成するハイブリッド細胞が単離される。所望の抗体を産生するハイブリッド細胞を選択し、そのクローン化された細胞を試験管内(in vitro)もしくは、生体内(in vivo)で培養することにより、高度の特異性および親和性を有する、本コブラナーPCBに特異的に反応するモノクローナル抗体(以下本抗体と記す。)を製造することができる。本抗体は、コブラナ

ーPCBの各同族体・異性体の塩素の結合位置、塩素の結合数の違い認識する。

【0012】C)【モノクローナル抗体を用いた測定方法】

本抗体を利用した測定方法としては、間接競合阻害法(ELISA法)、直接非競合阻害法(ELISA法)等による本コブラナーPCBの免疫分析をあげることができる。該分析は簡便かつ迅速に処理できる精度の高い分析方法である。

【0013】直接非競合阻害法は、たとえば、以下の方法によって行うことができる。基本的には、固体支持材に結合される一定量の第1抗体(即ち、本抗体)と試料中に含まれる遊離状態にあるコブラナーPCBを反応させ、次に未反応の状態にある第一抗体と該抗体の抗原となる、(直接または、リンカーを介して)標識が施されているコブラナーPCBを結合させた後、結合した上記抗原をその標識に基づき定量することによって、試料中に含まれる遊離状態にある本コブラナーPCBと反応した、固体支持材に結合された第一抗体(即ち、本抗体)の量を算出し、該算出値から試料中に含まれる遊離状態にある本コブラナーPCBの量を測定する。

【0014】リンカーを介して間接的に連結する場合、用いられるリンカーは、高分子量担体分子の自由に利用可能な反応基の共有結合を形成し得る少なくとも1種または、それ以上の反応基を含む化合物である。たとえば、2個から16個の間の架橋性炭素分子を含み、かつ反応基として1個またはそれ以上の反応基たとえばアミノ基、カルボキシル基等を有する化合物をあげることができる。具体的には、一般式 $H_2(CH_2)_nCOOH$ ( $n$ は2から16個までの整数)が好ましいものとしてあげられる。該不完全抗原の反応基を高分子量担体分子の反応基の1つに結合させる方法と同様な方法を用いることができる。

【0015】間接競合阻害法は、たとえば、以下の方法によって行うことができる。基本的には、固体支持材に結合された抗原と試料中に含まれる遊離状態にあるコブラナーPCBとの競合、たとえば固体支持材に結合される抗原であるコブラナーPCBと標識が施されている第2抗体によって認識される第1抗体の遊離抗原であるコブラナーPCBとの競合に基づいている。これに関連して、固体支持材への抗原であるコブラナーPCBの結合は直接またはリンカーおよび/または第1抗体(即ち本抗体)によって認識されない高分子量担体を介して間接的に起こり得る。ここで、第1抗体(即ち、本抗体)によって認識されない高分子量担体とは、前記の完全抗原(免疫原)化工程において用いることができる高分子量担体のうちで、第1抗体の製造において用いられない高分子量担体のことである。また、抗原であるコブラナーPCBをリンカーおよび/または第1抗体によって認識されない高分子量担体を介して間接的に結合する場合、

これらの結合には、前記の完全抗原(免疫原)化工程と同様な方法または準ずる方法を用いることができる。

【0016】リンカーを介して間接的に連結する場合、用いられるリンカーは、高分子量担体の自由に利用可能な反応基の共有結合を形成し得る少なくとも1種またはそれ以上の反応基を含む化合物である。たとえば、2個から16個の間の架橋性炭素分子を含み、かつ反応基として1個またはそれ以上の反応基たとえばアミノ基、カルボキシル基等を有する化合物をあげることができる。

具体的には、一般式 $H_2(CH_2)_nCOOH$ ( $n$ は2から16個までの整数)が好ましいものとしてあげられる。

【0017】抗原であるコブラナーPCBの直接または間接の結合に用いられる固体支持材としては、たとえばマイクロタイタープレートまたは試験管のプラスチック表面、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ガラスまたはプラスチック等からなるビーズ表面、ろ紙、デキストラン、セルロースもしくはニトロセルロースまたはその他の類似の材料の細片の表面等をあげることができる。

【0018】これらの固体支持材に、抗原であるコブラナーPCBを直接、またはスパーサーおよび/または第1抗体(本抗体)によって認識されない高分子量担体分子を介して間接的に結合する(以下コーティングと記す。)には、たとえば、あらかじめ、グルタルアルデヒドまたは、臭化シアン等を用いる通常の方法によって固体支持材の活性化を行う。活性化された固体支持材にコーティング材にコーティング液を添加した後、インキュベートすることによって第1抗体を産生する哺乳動物と同一種の哺乳動物の血清アルブミンとの結合体で表面をコートする。ここで用いるコーティング液としては、たとえば、140mMの塩化ナトリウムを含む約10mMリン酸緩衝液(pH7.4)等をあげることができる。コーティングの条件として、たとえば抗原であるコブラナーPCBまたはリンカーおよび/または第1抗体によって認識されない高分子量担体を有する抗原のコーティング液内の濃度は、たとえば抗原として約 $0.05\mu g/ml$ から約 $1\mu g/ml$ 等を好ましい条件としてあげることができる。使用する量としては96穴マイクロテストプレートを使用する場合には、たとえば約0.1ml/ウェル程度を好ましい条件としてあげることができる。またコーティング条件としては、約 $4^\circ C$ 、約6時間ないし24時間、好ましくは1晩をあげることができる。上記の具体的な例としては、たとえば固体支持材としてはポリスチレン製の96穴マイクロタイタープレートを使用して、第1抗体を産生させるための複合体(コブラナーPCBをリンカーを介して高分子量担体と結合したもの)に用いられる高分子量担体分子としてウシ等の動物の血清アルブミンまたはキーホールカサガイヘモシアニンを使用し、固体支持材に間接的に結合する際に用いられる高分子量担体分子として第1抗体に認識されない高分子量担体分

子であるヤギ等別種の動物の血清アルブミンを使用することがあげることができる。なお、第1抗体を産生する哺乳動物と同一種の哺乳動物の血清アルブミンとコブラナーPCBをリンカーを介して高分子量担体と結合したものの複合体の担体へのコーティング後、第1抗体の非特異的結合を防止するために、第1抗体を産生する哺乳動物と同一種の哺乳動物の血清アルブミン以外の蛋白で、第1抗体を産生する哺乳動物と同一種の哺乳動物の血清アルブミンが吸着していない部分をブロックすることが望ましい。この目的には、たとえば、約3%スキムミルク溶液と担体を約20℃前後で約2時間程度インキュベートする方法等が簡便なものとしてあげられる。このようにして得られた担体は、洗浄緩衝液（たとえば、0.05% tween20を含んだ0.15M塩化ナトリウム含有10mMリン酸緩衝液pH7.4）で洗浄した後に使用する。

【0019】このようにして得られる固体支持材に直接または間接的に結合するコブラナーPCBは次に、試料中に含まれる検出すべき抗原であるコブラナーPCBおよび第1抗体（本抗体）を含有する試験溶液と混合され、該混合物はインキュベートされる。なお、試料中に含まれる検出すべき抗原であるコブラナーPCBは、この際に遊離の形態で、または水もしくは作物、土壌、食品等の環境または生体試料中の成分として存在し得る。約10分間ないし約2時間のインキュベート後に混合物は第1抗体を認識し、そして結合する酵素等で標識された第2抗体とインキュベートされる。この酵素等で標識された第2抗体としては、たとえば、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、β-D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、マレートデヒドロゲナーゼ、グルコース-6-フォスフェートデヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ等の酵素を結合した第1抗体（本抗体）に対する抗体をあげることができる。具体的な例としては、第1抗体（本抗体）としてウサギ抗血清を使用する場合、第2抗体としてはペルオキシダーゼを結合した抗ウサギ免疫グロブリン（IgG）ヤギ免疫グロブリン（IgG）を好適なものとしてあげることができる。なお、該ウサギIgGヤギIgGは市販されており、容易に入手可能である。ペルオキシダーゼで標識される場合には、基質として過酸化水素、発色試薬としてジアミノベンジジンまたはO-フェニレンジアミンと組合わさって褐色または黄色を生じる。グルコースオキシダーゼで標識される場合には、基質として、たとえば2, 2'-アシド-ジ-（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸（ABTS）等を用いる。尚、第2抗体に結合した標識酵素と基質との酵素反応によって生じる発色を吸光度として、マルチスキャンニングスペクトロフォトメーター等の装置を用いて測定する。

【0020】なお、第2抗体に上記の酵素以外に、あら

かじめ蛍光色素を結合しておき、抗原抗体反応により、結合した抗体量を酵素活性でなく、蛍光強度で測定することにより、より感度の高い測定方法とすることができる。

【0021】また、本抗体の利用として、試薬として本抗体を少なくとも1種含有し、そして本コブラナーPCBの簡便でかつ迅速に処理できる精度の高い検出・分析のために野外条件下での使用に適している試験キットの形態にされた本コブラナーPCBの免疫学的検出・分析のための手段もあげることができる。上記の試験キットは、たとえば、次の構成成分を含有し得る。：（1）抗原であるコブラナーPCBを直接、またはリンカーおよびまたは第1抗体（本抗体）によって認識されない高分子量担体分子を介して間接的結合する固体支持材、（2）本発明抗体を含有する試薬（3）抗原である本コブラナーPCBの標準溶液（4）第1抗体（本抗体）を認識し、そして結合する酵素あるいは蛍光色素等で標識された第2抗体を含有する試薬、（5）緩衝液、（6）非特異的吸着および凝集体の形成を防止するポリペプチド、界面活性剤等の添加剤、および（7）ビベット、反応容器、計算曲線等。上記の固体支持材は、非常に広範囲のデザインを有し、そして使用に際して意図された特定の目的に応じて非常に異なる形状を有することができる。たとえば、皿、球、プレート、小型ロッド、セル、小型ボトル、小型チューブ、ファイバー、ネット等をあげることができる。具体的な例としては、透明プラスチック材料、たとえばポリ塩化ビニルまたはポリスチレンからなるマイクロタイタープレート、ポリスチレンからなる小球、チューブまたはロッド等が使用可能である。

【0022】上記方法で、水田水、水道水等の環境中の水系類をサンプルとする場合はサンプル中のコブラナーPCBを測定することができる。したがって、サンプル中のコブラナーPCBの濃度が上記より高濃度である場合には、サンプルを適宜希釈した後に使用する。油（化学処理油等）作物、土壌、食品等の環境または生体の試料中の非水系類をサンプルとする場合にはメタノール等の溶媒サンプルから本コブラナーPCBを抽出するか、または適当な固相支持体に吸着させた後、適当な方法で固相支持体から、適当な有機溶媒等を用いて支持体から本コブラナーPCBを後に使用する。このように調製した本コブラナーPCBを含有する有機溶媒を含有する緩衝溶液（または水溶液）を混合し、たとえば、約20℃前後で一晩インキュベートすることによって反応させる。この際、第1抗体（本抗体）は、約3,000〜約5,000倍に希釈して、サンプル中の本コブラナーPCBと反応させることが望ましく、特に5,000倍程度の濃度を望ましい条件としてあげることができる。即ち、約2,500倍程度に希釈した第1抗体を同用量の本コブラナーPCBを含有するサンプル液と混合し、約20℃で一晩反応さ

せることが望ましい。希釈液としては、たとえば、前記の洗浄緩衝液と同じ組成のものを用いることができる。なお、必要に応じて、第1抗体が過剰に希釈された場合の安定化のために保護タンパクとして、スキムミルク等を加えることが望ましい。

【0023】上記のように調製したサンプルと第1抗体の反応液に含まれる未反応の第1抗体を第1抗体を産生する哺乳動物と同一種の血清アルブミンとの複合体で表面をコーティングした固体支持材に結合させる反応を行う。この反応条件について、サンプルと第1抗体の反応液を固体支持材に添加し、たとえば約20°Cで、約1時間程度反応させることを望ましくあげることができる。反応後、前記の洗浄緩衝液で担体を洗浄した後、酵素等で標識され、かつ第1抗体を産生する哺乳動物と異なる種の哺乳動物に由来する第1抗体に対する抗体（第2抗体）との反応に供する。

【0024】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を説明する。本発明は下記の実施例にのみ限定されないことはいうまでもない。

【0025】〔実施例1〕 免疫抗原の作製

製造例1 複合体の調製（完全抗原（免疫原）化工程における高分子量担体分子の連結及び固体支持材に結合される抗原への高分子量担体分子の連結）

〔抗PCB-#77抗体作製のための複合体の調製〕4-ブロモ-2-クロロフェノールの水酸基をメチルエーテルで保護した後、3, 4-ジクロロヨードベンゼンとのグリニャール-クロスカップリング反応により、3, 3', 4-トリクロロ-4'-メトキシビフェニルを合成し、三臭素化ホウ素により、メチルエーテル基を水酸基に脱保護することで、3, 3', 4-トリクロロ-4'-ヒドロキシビフェニルを得た。これに、6-ブロモヘキサノ酸とエチルエステルを反応させ、エチルエステルをカルボン酸に加水分解することにより、6-(3, 3', 4-トリクロロビフェニル-4'-オキシ)ヘキサノ酸を5工程で通算収率44%で合成した。キャリアタンパク質への結合はカルボン酸をヒドロキシルスクシンイミドとの活性エステル体とした後、アミノ基とアミド結合を形成させ、PCB-#77を結合させたコンジュゲートを作成した。

4-ブロモ-2-フェノール

↓

4-ブロモ-2-クロロアニソール

↓

3, 4-ジクロロヨードベンゼン

↓

3, 3', 4-トリクロロ-4'-メトキシビフェニル

↓

3, 3', 4-トリクロロ-4'-ヒドロキシビフェニル

↓

6-エチル- (3, 3', 4-トリクロロビフェニル-4'-オキシ)ヘキサノエート

↓

6-(3, 3', 4-トリクロロビフェニル-4'-オキシ)ヘキサノ酸

↓

6-N-ヒドロキシルスクシンイミド- (3, 3', 4-トリクロロビフェニル-4'-オキシ)ヘキサノエート

【0026】〔抗PCB-#126抗体作製のための複合体の調製〕コンジュゲート#PCB-77の合成と同様に水酸基をメチルエーテル基で保護した後、3, 4, 5-トリクロロヨードベンゼンとのグリニャール-クロスカップリング反応により、3, 3', 4, 5-テトラクロロ-4'-メトキシビフェニルを合成し、三臭素化ホウ素により、メチルエーテル基を水酸基に脱保護することで3, 3', 4, 5-テトラクロロ-4'-ヒドロキシビフェニルを得た。これに、6-ブロモヘキサノ酸とエチルエステルを反応させ、エチルエステルをカルボン酸に加水分解することにより、6-(3, 3', 4, 5-テトラクロロビフェニル-4'-オキシ)ヘキサノ酸を5工程で通算収率35%で合成した。キャリアタンパク質への結合はカルボン酸をヒドロキシルスクシンイミドとの活性エステル体とした後、アミノ基とアミド結合を形成させ、PCB-#126を結合させたコンジュゲートを作成した。

3, 4, 5-トリクロロヨードベンゼン

↓

3, 3', 4, 5-テトラクロロ-4'-メトキシビフェニル

↓

3, 3', 4, 5-テトラクロロ-4'-ヒドロキシビフェニル

↓

6-エチル- (3, 3', 4, 5-テトラクロロビフェニル-4'-オキシ)ヘキサノエート

↓

6-(3, 3', 4, 5-テトラクロロビフェニル-4'-オキシ)ヘキサノ酸

↓

6-N-ヒドロキシルスクシンイミド- (3, 3', 4, 5-テトラクロロビフェニル-4'-オキシ)ヘキサノエート

【0027】〔抗PCB-#169抗体作製のための複合体の調製〕2, 6-ジクロロフェノールをジオキサン中で等量のジオキサジプロマイド錯体を反応させることにより、4-ブロモ-2, 6-ジクロロフェノールを合成し、以下、コンジュゲート#PCB-77の合成と同様に水酸基をメチルエーテル基で保護した後、グリニャール-クロスカップリング反応により、3, 3', 4, 5, 5'-ペンタクロロ-4'-ヒドロキシビフェニルを



得た。これに、6-ブロモヘキサン酸とエチルエステルを反応させ、エチルエステルをカルボン酸に加水分解することにより、6-(3, 3', 4, 5, 5'-ペンタクロロフェニル-4'-オキシ)ヘキサン酸を6工程で通算収率23%で合成した。キャリアタンパク質への結合はカルボン酸をヒドロキシスクシンイミドとの活性エステル体とした後、アミノ基とアミド結合を形成させ、PCB-#169を結合させたコンジュゲートを作成した。

4-ブロモ-2, 6-ジクロロフェノール

↓

4-ブロモ-2, 6-ジクロロアニソール

↓

3, 3', 4, 5, 5'-ペンタクロロ-4'-メトキシビフェニル

↓

3, 3', 4, 5, 5'-ペンタクロロ-4'-ヒドロキシビフェニル

↓

6-エチル-(3, 3', 4, 5, 5'-ペンタクロロビフェニル-4'-オキシ)ヘキサノエート

↓

6-(3, 3', 4, 5, 5'-ペンタクロロビフェニル-4'-オキシ)ヘキサン酸

↓

6-N-ヒドロキシスクシンイミド-(3, 3', 4, 5, 5'-ペンタクロロビフェニル-4'-オキシ)ヘキサノエート

【0028】[実施例2] 免疫感作

製造例2 哺乳動物の免疫感作化工程および本抗体取得工程

ウシ血清アルブミンを蒸留水に溶解し、リン酸緩衝液(pH8.0)で平衡化させたPD-10カラムにアブライシ、リン酸緩衝液(pH8.0)にて、展開溶出を行った。この操作によってリン酸緩衝液(pH8.0)中のウシ血清アルブミンを得た。16.7mgウシ血清アルブミン/0.5mlリン酸緩衝液(pH8.0)に製造例1によって得られたコンジュゲートを3.88mg(10μmol、1:40当量)を0.5mlのジメチルホルムアミド(DMSO)を加えて溶解した溶液を加え、室温にて30秒間攪拌後、4℃で1晩静置した。それぞれの反応液をリン酸塩緩衝食塩水で平衡化したPD-10カラムにアブライシ、リン酸塩緩衝食塩水で展開溶出を行った。吸光度測定より求めたPCB誘導体のコンジュゲートへの導入数はウシ血清アルブミン1分子あたり10~16分子であり、ウシ血清アルブミン分子中の導入可能なアミノ基の約30~50%が結合に使用された。各免疫原についてBa1b/Cマウス1群6匹(7週齢、雌)を用いて初回100μg/mouse、以下50μg/mouseで最大8~9回の免疫を行った。なお、抗原はアジュバントと乳化したもので、投与ルートはマウスの

腹腔内及びフットパッド内に投与した。

【0029】[実施例3] 抗PCB血清抗体産生の確認とハイブリドーマ細胞の作製

ハプテンに対する特異抗体産生が確認されたマウスに、抗原コンジュゲートを尾静脈内に投与、3日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製した。ミエローマ細胞(P3-X63/Ag.8)と脾臓細胞を1:5になるように混合し、ポリエチレングリコール(PEG)法にて細胞融合を行った。細胞をHAT添加10%ウシ胎児血清含有RPMI1640培地中に懸濁させ、2~5×10<sup>4</sup> cells/wellになるように96穴培養用マイクロテストプレートに播種し、5%炭酸ガス、37℃の条件で培養する。培養開始より、4~5日目に培地交換を行い1週間~10日目、最大1ヶ月目まで、クローンの増殖のみられたウェルの培養上清を用いてスクリーニングを行った。

【0030】[実施例4] モノクローナル抗体の評価;競争阻害ELISAによるPCBの測定

1. (ELISA法による抗体産生細胞のスクリーニング)  
PCB誘導体のヒドロキシスクシンイミドエステル0.02mmolとビオチン-ヒドラジド0.024mmolに300μlのDMFを添加して攪拌した後、室温16時間反応させる。反応終了後、逆相HPLC(ODS-80Tカラム:東ソー、溶媒:PCB-#77:72%アセトニトリルlinear、PCB-#126:80%アセトニトリルlinear、PCB-#169:90%アセトニトリルlinear、流速:2ml/分、1サイクル:40分間)で精製ビオチン標識PCBを調製した。PBS(-)〔カルシウム・マグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩液〕にて、10μg/mlに調製した抗マウスIgG抗体50μlを加え37℃、1時間インキュベートした後0.05%Tween20添加PBS(-) (以下「洗浄液」と略す。)で96穴マイクロタイタープレートの各穴を3回洗浄した。これにPBS(-)にて1%に調製したゼラチン(BIO-RAD社製)300μlを加えて、室温で2時間放置した(ブロッキング)。この96穴マイクロタイタープレートを上記洗浄液で3回洗浄した後、これにハイブリッド細胞の培養液(上清)を50μl/ウェルで添加し、室温で1時間反応した。この96穴マイクロタイタープレートを再び3回洗浄した後、50%DMFにて0.8μMに調製したビオチン標識PCBと50%DMFにて、0.01μM、0.1μM、1μMに調製した未標識PCB(PCB-#77、PCB-#126、PCB-#169)を25μlずつ加えて室温1時間反応後させる。ウェルを上記洗浄液で3回洗浄後、0.1%ゼラチン-PBS(-)で1,000倍に希釈した市販のペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Amaxam社製)50μlを添加し、室温1時間反応後、各ウェルを上記洗浄液で3回洗浄した。基質溶液〔3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine substrate system:KPL社〕50μlを添加し、室温で15分間インキュベートすることによって発色させた。そして等量の1Mのリン

酸を加えることによって、酵素反応を停止し、マイクロタイタープレートの各ウェルの発色をマルチスキャンニングスペクトロフォトメーター（タイターテック（社）製または同等のもの）を用いて450nmでの吸光度（対照波長655nm）を測定した。未標識PCB非存在下（50%DMSO存在下）の吸光度を100%とし、未標識PCB存在下での酵素反応による発色を阻害する程度が高いウェルをPCB特異的な抗体産生ウェルとした。

#### 【0031】2.（抗体産生細胞のクローニング）

上記のようにして特定した抗体産生ウェルを限界希釈法によって細胞クローニングを実施した。細胞クローニングの結果、抗体を産生しているクローン化細胞を得た。得られたクローン化細胞を10%ウシ胎児血清を含む培地で5%炭酸ガス、37℃条件下で培養し、その培養液を抗体溶液とした。さらに、該抗体溶液をアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、得られたタンパク質分画をPBS（-）で透析することによって本抗体を得た。クローン化したハイブリドーマに由来するモノクローナル抗体について、培養上清を精製した抗体を用いて、実施例4に記載した方法で反応性を調べた。また、この過程で、抗PCB抗体固相化時における抗マウスIgG（Fc認識）抗体の影響、試験系における反応液中のTween20の影響（至適濃度の選択）、抗PCB抗体・標識体・競合体の適切な組み合わせ（標識体の種類と濃度）を決定した。その結果得られた試験条件下で、目的に適合した抗体を選択した。PCB-#77測定系としては、抗体8-5B-12B（ビオチン標識PCB-#77：1.6×10<sup>-7</sup>Mで使用）、PCB-#126測定系としては、抗体4-6B-19F（ビオチン標識PCB-#77：8×10<sup>-7</sup>Mで使用）、PCB-169測定系としては、抗体7-3C-4C（ビオチン標識PCB-#169：1.3×10<sup>-7</sup>Mで使用）を選択した。抗体8-5B-12Bは、ハイブリドーマPCB77-B（工業技術院生命工学工業技術研究所寄託FERM P-17098）が産生するモノクローナル抗体である。抗体4-6B-19Fは、ハイブリドーマPCB77-A（工業技術院生命工学工業技術研究所寄託FERM P-17097）が産生するモノクローナル抗体である。抗体7-3C-4CはハイブリドーマPCB169-E（工業技術院生命工学工業技術研究所寄託FERM P-17099）が産生するモノクローナル抗体である。

【0032】図1～3にコブラナPCBの標準曲線を示した。20%阻害を抗原濃度の検出限界値とした場合、各測定系の本条件下における検出限界値は、PCB-#77測定系では、8.08×10<sup>-8</sup>M（23.0ppbに相当、アッセイ系あたりの検出限界値：0.59ng）、PCB-#126測定系では、2.10×10<sup>-8</sup>M（6.85ppbに相当、アッセイ系あたりの検出限界値：0.17ng）、PCB-#169測定系では、1.22×10<sup>-8</sup>M（4.40

ppbに相当、アッセイ系あたりの検出限界値：0.11ng）であった。

#### 【0033】[実施例5] 測定対象以外のPCBと本発明抗体との反応性（本抗体の特異性の確認）

PCBを測定対象とする実試料（廃油、環境試料等）中には、測定対象とするPCB以外の異性体が共存していると推定されるため、抗体の特異性の評価では、異性体個別の交差反応性の比較だけではなく、実試料でのPCB異性体共存下における目的PCBの測定が求められるという状況を反映したかたちで、抗体の特異性を評価した。

#### 【0034】④ 抗PCB-#77抗体（8-5B-12B）の特異性評価

抗PCB-#77抗体（8-5B-12B）については、図4に示すように、交差反応性が予想されるPCB異性体の混合物（表1）との交差反応性をみるために、あらかじめ予備試験を行った。

#### 【0035】

#### 【表1】

交差反応性評価化合物のグループ別一覧

Group No.	交差反応性検討に用いた化合物群
1	PCB-#77
2	PCB-#126
3	PCB-#169
4	PCB-#1,-#2,-#3
5	PCB-#5,-#9,-#12,-#14
6	PCB-#4,-#6,-#8
7	PCB-#11,-#13,-#15
8	PCB-#21,-#29,-#38
9	PCB-#20,-#26
10	PCB-#33,-#35,-#37
11	PCB-#78,-#81
12	PCB-#127
13	Biphenyl
14	2-Hydroxybiphenyl

【0036】この結果から、PCB-#126との交差反応性が、認められるもののPCB-#77に特異な抗体であると判断された。このため、さらにPCB-#126存在下において、抗PCB-#77抗体（8-5B-12B）とPCB-#77との抗原抗体反応に与える影響を検討した。その結果、図5に示すように、PCB-#126の混在量が10倍以下であれば、測定結果への影響は少ないと考えられた。

#### 【0037】⑤ 抗PCB-#126抗体（4-6B-19F）の特異性評価

抗PCB-#126抗体(4-6B-19F)については、①と同様に図6に示すように、PCB異性体との交差反応性をみるために予備試験を行った。PCB-#126との反応性が最も高いが、PCB-#77及びグループ11(PCB-#78とPCB-#81の混合物)とも交差反応性が認められた。そこで、PCB-#77、PCB-#78、PCB-#81、PCB-#169混合物を初濃度 $1 \times 10^{-6}$ M、 $1 \times 10^{-7}$ Mに調整し、等量のPCB-#126を $2 \times 10^{-7}$ M $\sim 1 \times 10^{-5}$ Mの濃度範囲(初濃度)で混合して測定し、抗PCB-#126抗体(4-6B-19F)とPCB-#126との抗原抗体反応に与える影響を検討した。この結果を図7に示す。PCB-#126の測定系では、混在量が5倍以下であれば、混在の影響はほとんどないと考えられた。

【0038】③ 抗PCB-#169抗体(7-3C-4C)の特異性評価

抗PCB-#169抗体(7-3C-4C)については、①、②と同様に図8に示すように、PCB異性体との交差反応性をみる目的で、PCB異性体との交差反応性をみる予備試験を行った。PCB-#169との反応性が最も高いものの、PCB-#126とグループ11(PCB-#78とPCB-#81の混合物)、グループ12(PCB-#127)との交差反応性が認められた。そこで、PCB-#77、PCB-#126、グループ11(PCB-#78、PCB-#81の等濃度混合物)、グループ12(PCB-#127)混合物を $1 \times 10^{-8}$ M、 $5 \times 10^{-8}$ M濃度で共存下に測定を行った。その結果、図9に示すようにPCB-#169測定系においては、ppbレベルのPCB-#169の存在に対し、干渉する可能性のあるPCBの混在量が2倍以下であれば、測定結果への影響は少ないが、10倍量以上では測定値に正の誤差を与える。

【0039】【実施例6】 抗体の溶媒耐性(ジメチルスルホキシド及びメタノール)

実施例4で選択した各抗体を用いて、同法で示した競合ELISA法により、ジメチルスルホキシド(DMSO)への耐性を調べた。DMSOは、競合反応時の溶液に含まれる最終濃度が各々10%から50%になるように添加した。PCB-#77抗体におけるDMSOの影響を図10に、PCB-#126抗体におけるDMSOの影響を図11に、PCB-#169抗体におけるDMSOの影響を図12に示す。図10のPCB-#77抗体では、DMSOの濃度が30%以下の条件で、PCB-#77濃度が高濃度側で反応値の低下が認められたが、図10から図12に示すように、その他の系では、DMSOの濃度を下げることにより、測定範囲、検出感度の上昇傾向が認められた。また、図には示さなかったが、D

MSOの濃度が70%以上ではほとんど反応性を認めなかった。以上の結果から、本モノクローナル抗体では、DMSOの最終濃度が50%では、測定感度が低下するものの、各PCBを測定できることが明らかになった。【0040】同様に本抗体のメタノール(メチルアルコール)耐性については、メタノールの濃度を最終濃度として50%、70%、90%を含む緩衝液で溶解することによって溶液状態にしたコブラナーPCBビオチン標識体を試料とした。それぞれの抗体を用いる分析はメタノールの最終濃度70%以上では抗PCB-#126抗体(4-6B-19F)と抗PCB-#77抗体(8-5B-12B)は反応の阻害が認められたが、50%では反応が認められた。したがって、メタノールの濃度0~50%の範囲においてこれら抗原抗体反応は十分可能であった。さらに抗PCB-#169抗体(7-3C-4C)は70%メタノールでも反応が認められたことから、メタノールの濃度0~70%の範囲において、抗原抗体反応に対する影響は軽微であり、測定は十分可能であった。

【0041】

【発明の効果】本発明方法により、コブラナーPCB、特にそのなかで特別に毒性の高いPCB-#77、PCB-#126、PCB-#169と特異的に反応し、かつ有機溶媒(メタノール、ジメチルスルホキシド)中においてもその特性を保持するモノクローナル抗体を提供することを可能にした。該抗体は、たとえば、油(化学処理油等)、土壌、水、食品等の環境または生体試料中の該化合物の分析において、特に有機溶媒抽出の前処理を必要とする試料の分析において、簡便でかつ迅速に処理できる精度の高い分析を可能にした。

【図面の簡単な説明】

【図1】PCB-#77の標準曲線である。

【図2】PCB-#126の標準曲線である。

【図3】PCB-#169の標準曲線である。

【図4】抗PCB-#169抗体の交差反応性/単品を示す。

【図5】夾雑PCB存在下でのPCB-#77の測定を示す。

【図6】抗PCB-#77抗体の交差反応性/単品を示す。

【図7】抗PCB-#126抗体の抗原抗体反応への他成分混在効果を示す。

【図8】抗PCB-#169抗体の交差反応性/単品を示す。

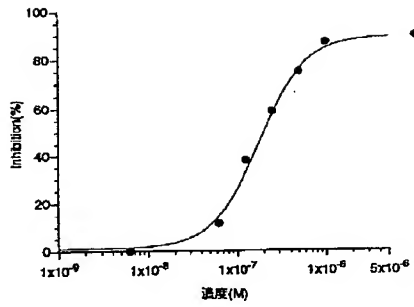
【図9】夾雑PCB存在下でのPCB-#169の測定を示す。

【図10】抗PCB-#126抗体の溶媒耐性を示す。

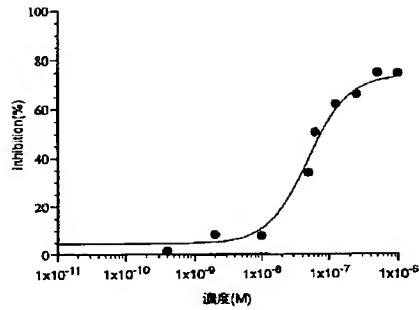
【図11】抗PCB-#77抗体の溶媒耐性を示す。

【図12】抗PCB-#169抗体の溶媒耐性を示す。

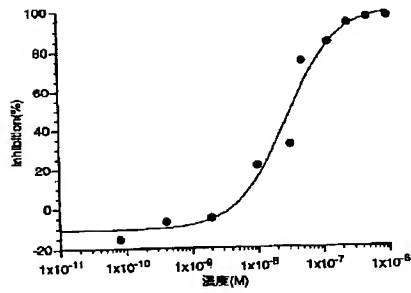
【図1】



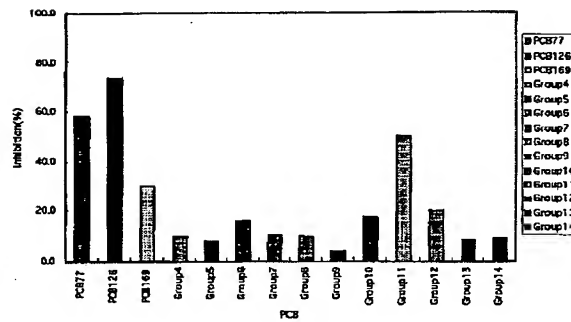
【図2】



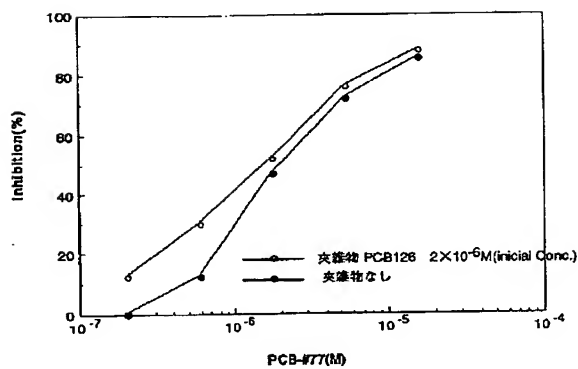
【図3】



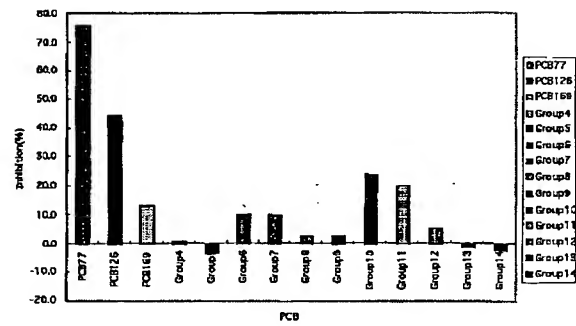
【図4】



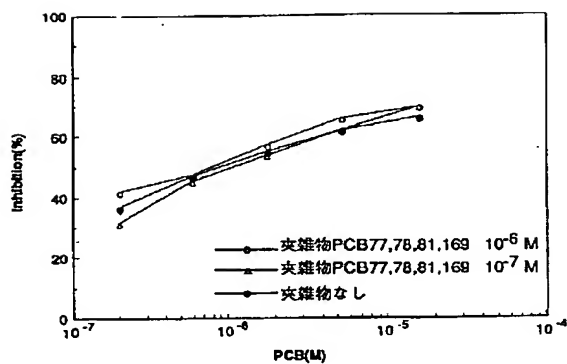
【図5】



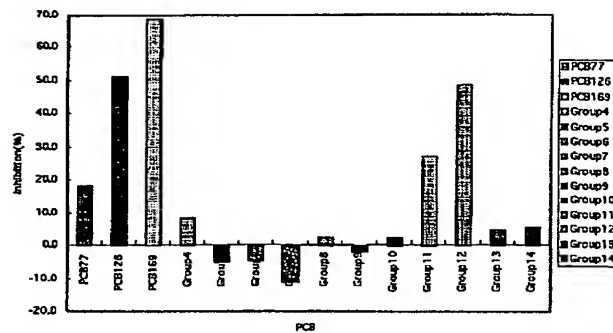
【図6】



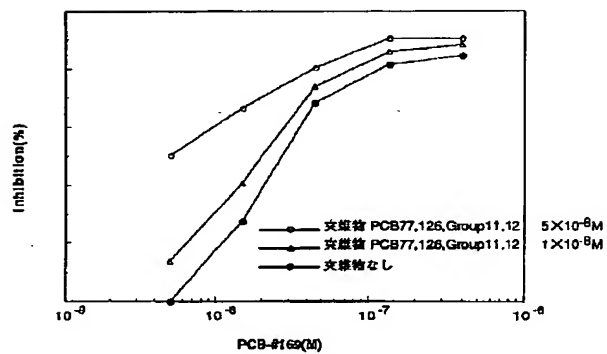
【図7】



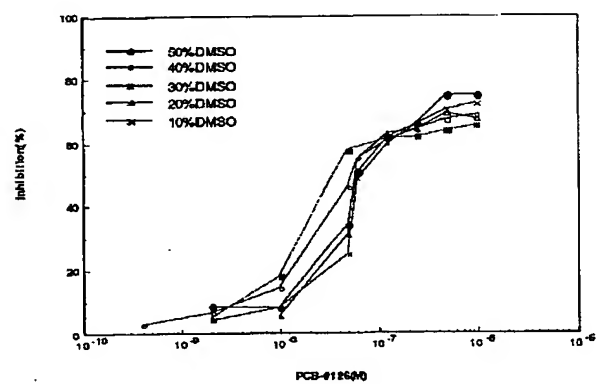
【図8】



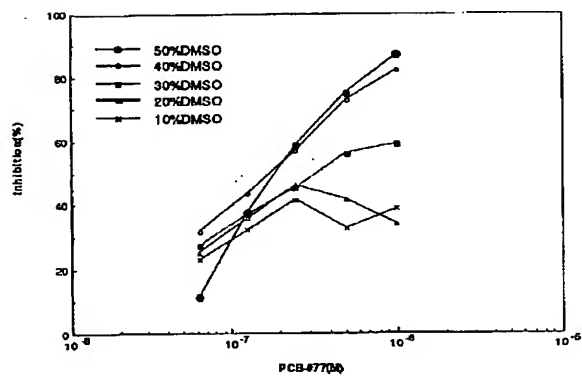
【図9】



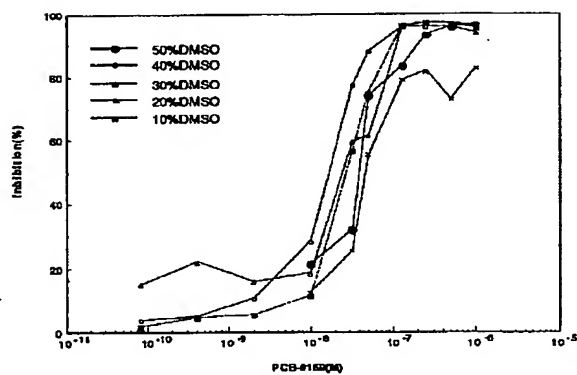
【図10】



【図11】



【図12】



## 【手続補正書】

【提出日】平成11年6月30日(1999. 6. 30)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コブラナーPCBを認識するモノクローナル抗体であって、50(v/v)%有機溶媒水溶液中でも抗原認識特性が実質的に低下しないモノクローナル抗体。

【請求項2】 コブラナーPCBが3, 4, 3', 4'-テトラクロロビフェニル(PCB-#77)、3, 4, 5, 3', 4'-ペンタクロロビフェニル(PCB-#126)または3, 4, 5, 3', 4', 5'-ヘキサクロロビフェニル(PCB-#169)である請求項1記載のモノクローナル抗体。

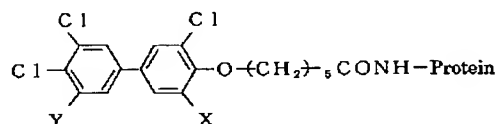
【請求項3】 有機溶媒水溶液又は有機溶媒を含まない緩衝液(水溶液を含む)に存在するコブラナーPCBを請求項1または2記載のモノクローナル抗体と接触させて抗原抗体複合体を形成させ、該複合体の形成量を測定することを特徴とするコブラナーPCBの測定方法。

【請求項4】 コブラナーPCBを含有する油性検体に\*

\*有機溶媒を接触させて、油性検体中のコブラナーPCBを有機溶媒中に抽出し、該有機溶媒中のコブラナーPCBをモノクローナル抗体を用いて測定し、そして油性検体中のコブラナーPCBに換算することを特徴とする、油性検体中のコブラナーPCBの測定方法。

【請求項5】 モノクローナル抗体が請求項1~2記載のいずれかのモノクローナル抗体である請求項4記載の油性検体中のコブラナーPCBの測定方法。

【請求項6】 下記式で表される、コブラナーPCBに特異性を示す抗体を形成しうる抗原。



(但し、式中、X及びYは水素原子又はClであり、Proteinは分子量約1万から15万のリジンに富む蛋白質である。)

【請求項7】 該リジンに富む蛋白質が、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、ヤギ血清アルブミン、オボアルブミン及びキーホールカサガイヘモシアニンから選ばれる請求項6記載の抗原。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

ターマコード(参考)

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/00

C

(C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 N 15/02

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 渡邊 真澄

京都府宇治市大久保町北ノ山103-43

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA41 GA05 HA15

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13

4B065 AA92X AB05 BA08 CA25

CA46

4H045 AA11 AA30 DA76 EA50 FA72

GA10 GA26